

Semmelweis Egyetem ÁOK, Szemészeti Klinika (igazgató: Németh János egyetemi tanár),¹
 Debreceni Egyetem OEC, Orvosi Vegytani Intézet (igazgató: Gergely Pál akadémikus, egyetemi tanár),²
 MTA DE, Sejtbiológiai és jelátviteli kutatócsoport
 (vezető: Gergely Pál akadémikus, egyetemi tanár)³ közleménye

Peroxinitrit-képződés és poli(ADP-ribóz) polimeráz aktiváció a szemben

GÉHL ZSUZSANNA,¹ NÉMETH JÁNOS,¹ VIRÁG LÁSZLÓ^{2,3}

Összefoglalás: A nitrogén-monoxid (NO) származékai közül a peroxinitrit az egyik legreaktívabb vegyület, melynek mind a fehérjeoxidációban, mind a lipidperoxidációban kiemelkedő szerepe van. A peroxinitrit DNS-törések létrehozásával citotoxikus folyamatokat indukál – többek között – a poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) enzim aktiválódásával. Míg az oxidáns vegyületek toxikus hatása jól ismert, az általuk indukált sejtpusztulás mechanizmusa (apoptózis és nekrosis), illetve ezekben a PARP-1 szerepe napjainkban is számos kérdést vet fel. Munkánkban a szem fiziológiás és patológias folyamataiban megfigyelt peroxinitrit-képződéssel és PARP-aktivációval járó folyamatok szerepét tárgyaljuk.

Kulcsszavak: peroxinitrit, poli-ADP-riboziláció, oxidatív stressz, szem, retina

Peroxynitrite production and poly(ADP-ribose) polymerase activation in the eye

Summary: Among the reactive species produced from nitric oxide (NO), peroxynitrite is one of the most reactive molecule, which plays an important role in both protein oxidation and lipid peroxidation. Peroxynitrite can also trigger DNA breaks and cytotoxicity – at least in part – through the activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1. Although the cytotoxic effects of reactive oxygen and nitrogen species is well known, the mechanism of oxidant-induced cytotoxicity is not fully understood. In this review we discuss the role of peroxynitrite and PARP activation in the physiological and pathological processes of the eye.

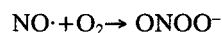
Key words: peroxynitrite, poly(ADP-ribosyl)ation, oxidative stress, eye, retina

A peroxinitrit és a poli-ADP-riboziláció kapcsolata és biológiai jelentősége

Számos, különösen a gyulladásos, degeneratív és ischaemia-reperfúzió (I/R) alapuló betegségben jól ismert a reaktív oxigén- és nitrogéntartalmú intermedierek (ROI/RNI) patogenetikai szerepe. A ROI/RNI okozta szövetkárosodási útvonal egy késői, így klinikai beavatkozásra is elegendő időt (széles terápiás ablakot) engedő lépése a poli(ADP-ribóz) metabolizmusának fokozódása. A poli-ADP-riboziláció a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek által katalizált, sokrétű biológiai funkcióval bíró poszttranszlációs fehérjemódosítási folyamat, melynek szerepet tulajdonítanak a sejthalál, a DNS-hibajavítás, a replikáció, a transzkripció és differenciálódás szabályozásában.³¹ A poli-(ADP-ribóz) metabolizmusát gátló beavatkozásokkal a fenti betegségek állatmodelljeiben kiváló eredményeket értek el.

Az oxidatív stresszben termelődő ROI/RNI specieszek közül az egyik legérdekesebb a peroxinitrit (ONOO⁻), mely a nitrogén-monoxid (NO) és a szuperoxid reakciójában keletkező RNI speciesz. A számos fiziológiás funkcióval bíró NO a nitrogén-monoxid-szintetáz (NOS) enzimek által katalizált reakcióban keletkezik L-argininből. Az NO-donorok önmagukban, oxidatív stressz

hiányában, többnyire még nagy koncentrációban sem citotoxikusak. Oxidatív állapotokban a mitokondriális respiratorikus láncban szuperoxid-anion képződik. Bár a szuperoxid hatását többnyire semlegesíti a szuperoxid-diszmutáz (SOD), fokozott NO-termelés és egyidejű szuperoxid-képződés esetén a két szabad gyök egymással reagálva egy még reaktívabb intermediert, a peroxinitritet hozza létre:



A két szabad gyök között lezajló reakciósebességi állandója nagyobb a SOD és a szuperoxid közötti reakciójánál, ezért a peroxinitrit képződésére reális lehetőség nyílik biológiai rendszerekben is. Bár maga a peroxinitrit nem szabad gyök (párosítatlan elektronnal nem rendelkezik), mégis igen reaktív vegyület, mely többek között lipidperoxidációt, fehérjeoxidációt indukál, és DNS-töréseket hoz létre.

Fontos megfigyelés, hogy míg a peroxinitrit kis koncentrációban apoptózist indukál, addig nagyobb koncentrációban nekrosis kialakulásához vezet. Egyre növekvő számú megfigyelés igazolja, hogy – a korábbi általános vélekedéssel szemben – az oxidatív stressz nyomán kialakuló nekrosis nem egy passzív, szabályozást nélkülöző folyamat. A nekrotikus sejthalál egyik aktív és farma-

kológiai beavatkozással befolyásolható eleme a PARP-1 aktivációja.

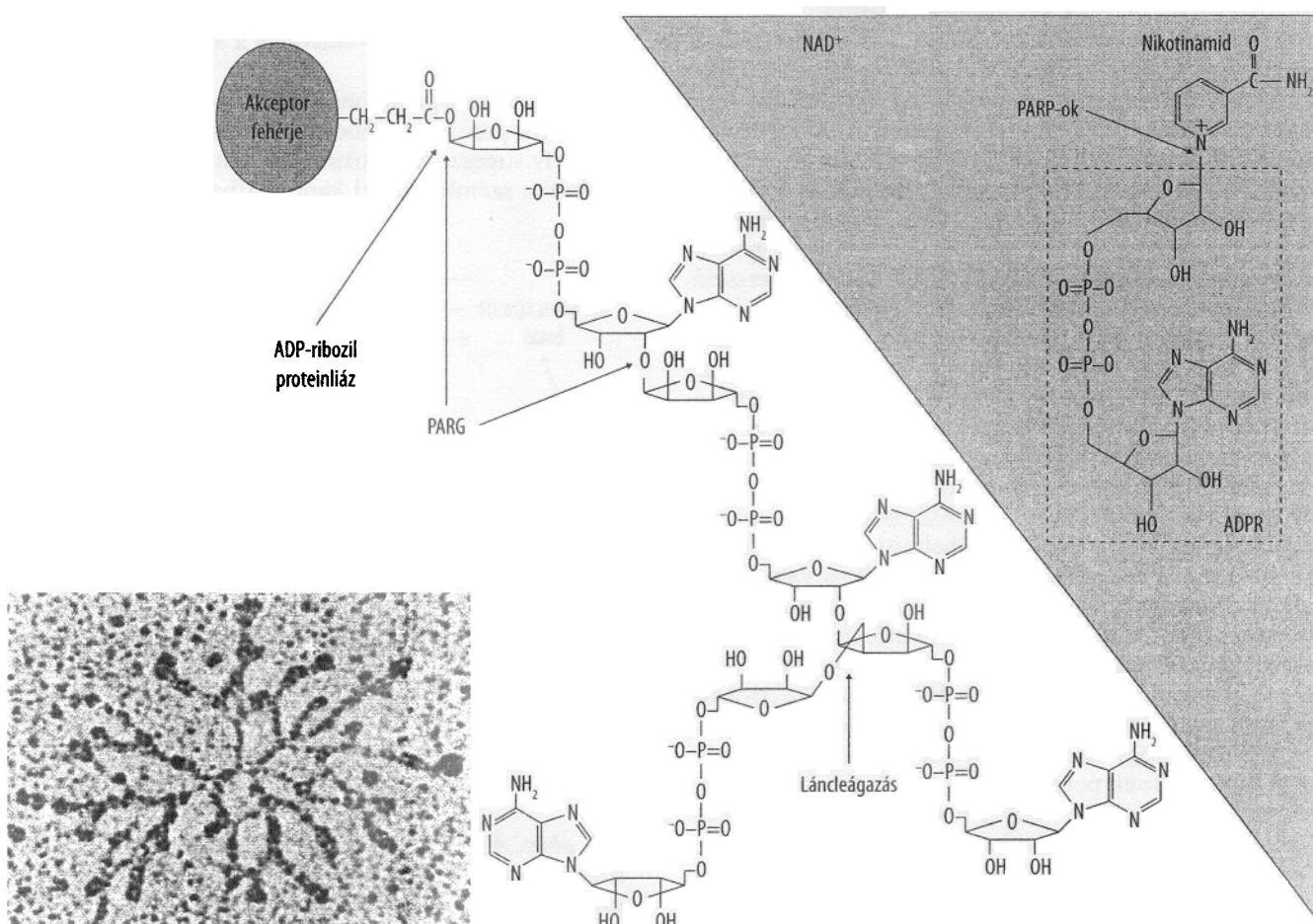
A 17 tagú PARP enzimes család legfontosabb tagja a PARP-1 enzim a sejtmagban található, és a DNS-molekulán kialakuló egyszálú vagy kétszálú törések hatására aktiválódik. Az aktivált PARP-1 NAD^+ (nikotinamid-adenin dinukleotid) molekulákból ADP-ribóz egységeket lehasítva, azokból egy nukleinsavszerű poli(ADP-ribóz) polimert képez (1. ábra). A polimer fontos jelzőszerepet játszik a DNS-hibajavító enzimeknek a sérülés helyére történő irányításában. Súlyos DNS-károsodás esetén azonban az enzim szubsztrátjának, a NAD-nak a depleciója sejtdiszfunkciót és sejthalált okozhat. A NAD^+ molekula újrászintézise ugyanis a másik hasítási termékből, a nikotinamidból kiindulva történik 4 ATP-molekula felhasználásával. A fent vázolt folyamat tehát jelentős energia (ATP) felhasználásával jár. Mivel az apoptotikus folyamatok is ATP-függőek, így érthető, hogy egy bizonyos szintű PARP-aktiváció felett az apoptózis ATP hiányában leáll, és a sejthalál nekrosis formájában zajlik le. A PARP-1 aktivációjának mértéke tehát döntő lehet a kétféle sejthalál arányának kimenetelében.²⁹ Ezt alátámasztja az a tény is, hogy a PARP enzim gátlása farmakológiai inhibitorokkal, vagy a knock out állatokban

a PARP funkcionális hiánya számos betegség kialakulása ellen jelent védelmet. A PARP-1 kettős mechanizmussal vesz részt az oxidatív stresszel járó betegségek kialakulásában:

1. túlzott aktivációja sejthalált okoz (ld fent);
2. szerepet játszik a gyulladásos mediátorok (citokinek, kemokinek, iNOS, adhéziós molekulák, mátrix metalloproteinázok) NF κ B-függő transzkripció szabályozásában.

A PARP-1 egyik fontos funkciója számos gyulladásban érintett fehérje transzkripció szabályozása. Ilyenek az iNOS, intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) és az MHC II hisztokompatibilitási antigének. E fehérjék szabályozásában az NF κ B transzkripció faktor kulcs szerepet játszik. Úgy tűnik, a PARP ebben a folyamatban az NF κ B kofaktoraként vesz részt. A PARP-1 transzkripció szabályozó működésében lényeges lehet a kromatin fellazítása, ami a hisztonok poli-ADP-ribózilációja révén valósul meg. A negatív töltésű polimerek és a DNS közötti elektrosztatikus taszítás lazítja a kromatin szerkezetét, miáltal a gének elérhetővé válnak a transzkripció apparátus számára.²¹

Azokban a betegségekben, ahol a nekrotikus típusú sejthalál dominál (stroke, myocardialis infarktus, I/R),



1. ábra. A poli-ADP-ribóziláció mechanizmusa. A PARP enzimek a NAD -ot nikotinamidra és ADP-ribózzra hasítják, és az utóbbiból elágazó PAR-polimereket szintetizálnak megfelelő akceptor fehérjékhez kapcsolva. A polimerek lebontását a PARG enzim végzi, míg a fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó ADP-ribóz egységet az ADP-ribózil proteinliáz távolítja el

a károsodás mellett fokozott PARP-aktivitást észleltek míg PARP-gátlók alkalmazásával szembetűnő protektív hatást értek el.³² A masszív sejthalállal nem kísért de erős gyulladásos komponenssel jellemzett betegségekben (colitis, arthritis, diabetes) valószínűbb, hogy a PARP patogenetikai szerepe a gyulladásos mediátorok termelődésének szabályozásán keresztül valósul meg (2. ábra).

Ebben az összefoglalóban a peroxinitrit és a PARP-aktiváció szembetegségekben betöltött szerepével kapcsolatos ismereteinket foglaljuk össze.

Peroxinitrit-képződés és PARP-aktiváció a szaruhártya betegségeiben

A szaruhártya a rajta keresztülhaladó UV fény nagy részét elnyeli, így joggal feltételezhető hogy az UV fény a bőrben tapasztalhatóhoz hasonló oxidatív stresszt vált ki a szaruhártyában. Ugyanakkor a szaruhártya és – a retina kivételével – a szem egésze szuperoxiddal szemben nem rendelkezik fokozott védelemmel,¹ így a szuperoxid és a belőle származó ROI/RNI specicszek – DNS-károsodás révén – PARP-aktivációt válthatnak ki a szaruhártyában.

Keratoconus, keratopathia bullosa és Fuchs-disztrófiában szenvedő betegek keratoplastica során eltávolított corneáit vizsgálva azt találták, hogy a NOS-expresszió, a tirozinnitrálás és a lipidperoxidációs markerek alapján e betegségek jellegzetes oxidatív/nitrozatív profillal rendelkeznek.⁴ Bár iNOS mindhárom esetben kimutatható volt, a peroxinitrit termelődését jelző nitrotirozin viszont főleg a keratoconus esetében volt kiemelkedő. Az iNOS expressziója némileg meglepő eredménynek tekinthető keratoconusban, hiszen ez a cornea-stroma nem gyulladásos eredetű elvékonyodása. Bár az iNOS-expresszió kiváltó oka nem ismert keratoconusban, az NO és a peroxinitrit célpontjai között felmerültek a mátrix metalloproteinázok. Míg az NO a zselatináz aktivációja, addig az ONOO⁻ a TIMP-1 (metalloproteináz inhibitor) gátlása révén járulhat hozzá a keratoconus kialakulásához.³

Yanagiya és mtsai exogén peroxinitrit hatásait vizsgálta a szemben.³³ Egy peroxinitritet kibocsájtó anyag, a SIN-1 elülső szemcsarnokba fecskendezését követően a cornea megvastagodását, a cornea endothelsejtjeiben nekrozisra jellemző mitokondriális és citoplazmatikus vakuolizációt és a mozaikos rajzolat felszakadását tapasztalták. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az *in vivo* peroxinitrit-termelődés is az endothelsejtek károsításával cornea-oedemához vezethet. Bár a PARP-aktiváció szerepét nem vizsgálták ebben a modellben, érdemes megjegyezni, hogy hasonló ultrastrukturális elváltozásokat tapasztaltunk peroxinitrittel kezelt timocitákon is, melyek teljes mértékben a PARP-aktiváció következményeinek bizonyultak.³¹ Mindezek alapján feltételezhető, hogy a SIN-1 cornealis hatásai is – legalább részben – a PARP közvetítésével jöhetnek létre.

A fotorefraktív műtétek kapcsán a figyelem középpontjába került a cornea sebgyógyulási folyamata is. Az egyik ilyen vizsgálatban³⁴ a cornea epitheliumát ért sérülés hatására a bazális sejtek és stromális keratociták

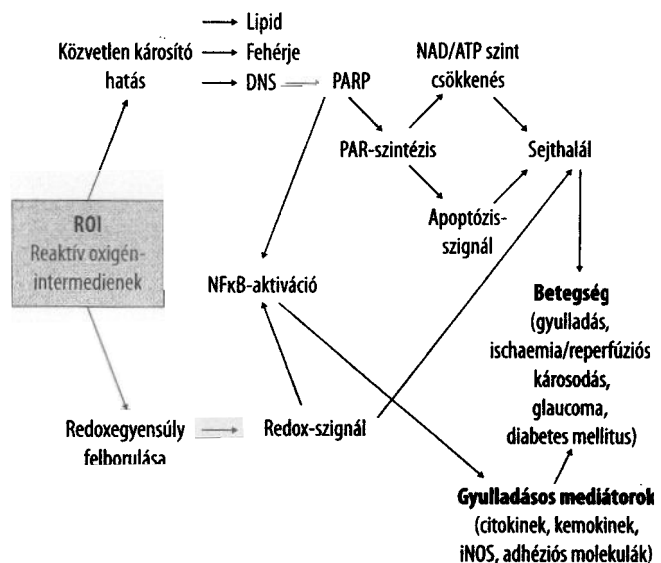
masszív fibronektintermelésbe kezdtek. A fibronektinről ismert volt, hogy a MAP kináz útvonalon keresztül aktiválja az Sp1 transzkripció faktorot, ami a PARP-1 expressziójának is egyik fontos szabályozó eleme. Ennek alapján nem meglepő, hogy fibronektin hatására fokozódott a PARP-1 expressziója nyúlcornea epithelsejtjeiben, ami felveti a PARP-1 lehetséges szerepét a cornealis sebgyógyulás proliferatív fázisában.

Peroxinitrit-képződés és PARP-aktiváció az uveában

A humán uveitis gyakran alkalmazott állatmodellje a Lewis patkányok endotoxin által kiváltott uveitise. Ennek során a talpba fecskendezett endotoxin hatására uveitis alakul ki, amit többek között az iris mononukleáris infiltrációja jelez. Ebben az állatmodellben a vízdoldékony PARP-gátló PJ34 szignifikánsan csökkentette az iris mononukleáris infiltrációját.¹⁷ A PARP-nak az uveitis patogenezisében betöltött szerepét részleteiben nem vizsgálták, de valószínűleg részben az oxidatív stressztől függő, részben attól független módon a gyulladásos jelátvitel és transzkripció szabályozása révén fejt ki. A PARP által szabályozott gyulladásos mediátorok és szabályozó elemek közül a MAP kinázok, az NFκB és az ICAM-1 szerepe valószínűsíthető.

Oxidatív stressz és PARP-aktiváció a szemlencsében

A lencse a szem legalacsonyabb SOD-aktivitású része.¹ A cataracta patogenezisében is fontos szerepet játszik az oxidatív stressz. A peroxinitrit jelentőségét is többen vizsgálták a szemlencsével kapcsolatban. A peroxinitrit



2. ábra. A poli-ADP-ribosiláció szerepe oxidatív stresszel járó betegségekben. A reaktív intermedierek károsítják a makromolekulákat. A DNS-törések a PARP aktivációját, és súlyos esetben ennek révén sejthalált okozhatnak. A PARP az NFκB koaktivátoraként a gyulladás fokozásával is hozzájárulhat a patológiás elváltozásokhoz oxidatív stresszel jellemzett betegségekben

hatására például jelentős oxidatív és nitrozatív átalakulás zajlik a lencse fehérjeiben (alfa-, béta- és gamma-krisztallin). Az extenzív fehérjemódosítások ellenére az alfa-krisztallin megőrizte chaperon funkcióját. Peroxinitrit hatására depletálódhat a szemlencse glutationkészlete is,³⁰ ami tovább érzékenyítheti a szemlencsét oxidatív károsodásokkal szemben. Érdekes megfigyelés, hogy piruvát hatékonyan gátolja a glutation peroxinitrit általi oxidációját.³⁰

A PARP szerepe a lencse fiziológiás és patológiás folyamataiban némileg ellentmondásos. Ezt példázzák a normál és cataractás lencsékkel kapcsolatos vizsgálatok. Immortalizált egér lencseepithel sejtenyészetén a H_2O_2 által kiváltott excesszív sejtkárosodás a glutation, a NAD és az ATP depléciójával, a pumpafunkciók gátlásával és kiterjedt DNS-töréssel volt jellemezhető. A NAD- és ATP-depléció, valamint a sejthalál a PARP-gátló 3-aminobenzamiddal csökkenthető volt,²⁷ ami a PARP aktív szerepét igazolja a lencseepithel-sejtek oxidatív stressz által kiváltott sejthalálában. Másrészt a szintén PARP-aktíváló hatású DNS-alkiláló szerrel, metilnitrozourea-val cataractássá tett patkányokban PARP-gátló hatású nikotinamidot és 3-aminobenzamidot alkalmazva fokozott kataraktogenezist észleltek.¹⁸ Ez a látszólag ellentmondásos helyzet összhangban van a PARP sejthalálban játszott komplex szerepével, mely szerint enyhe genotoxikus stimulus esetén a PARP-aktiváció a DNS-hibajavítás segítségével a sejtek túlélését eredményezheti, míg intenzív DNS-károsodás esetén az enzim túlzott aktivációja aktívan pusztítja a sejtet.

Poli-ADP-riboziláció a daganatterápiában

A daganatterápia célja a daganatsejtek elpusztítása. Mivel a poli-ADP-riboziláció fontos szerepet játszik egyes sejthalálformák szabályozásában, így nem meglepő, hogy a PARP-gátló szerek klinikai kipróbálásának első terepe is a daganatterápia volt. Érdekes módon, a PARP-gátló szereket mind sejtvédő, mind sejtölést potenciózó szerekként is lehet alkalmazni. Míg erős oxidatív stresszel és nekrotikus sejthalállal jellemzett betegségekben (szívizom I/R sérülés, stroke) a PARP-gátlók a nekrotikus gátlásával citoprotektív hatást fejtenek ki, addig a citosztatikumok, sugárterápia esetében a DNS-hibák kijavításának gátlásával fokozhatják a daganatterápia hatékonyságát. A már publikált klinikai kipróbálások eredményei alapján temozolomiddal kezelt melanómás betegekben a PARP-gátló szer fokozta az alkilálószer tumorelles hatását. Szemtumorkban egyelőre sem hasonló humán, sem állatkísérletes eredmények nem állnak rendelkezésünkre. A PARP-gátló szerekkel végzett adjuváns tumorterápia hatékonysága szempontjából fontos tényező, hogy a daganatsejtek milyen mértékben expresszálják PARP-1-et. Két bőrmelanómás anyagokon végzett tanulmány^{7,28} igazolja a PARP-1 expressziója és a melanoma stádiumai közötti összefüggést. Előzetes, nem publikált eredményeink alapján bőrmelanómákban mi is találtunk összefüggést a melanoma szövettani típusa és a PARP terméke, a poli-ADP-ribóz szöveti szintje között (a metasztatizációban nagyobb, a felszínesen terjedő for-

mákban kisebb PAR-tartalom). Uvealis melanómákban is jelentős variabilitást tapasztaltunk a különböző tumork között, de a minták kis száma miatt ezt nem lehetett szövettani altípusokkal vagy stádiummal összefüggésbe hozni. A tumorokban megfigyelhető PARP-expressziós és aktivitásbeli különbségek meghatározása lehetőséget teremthet a PARP-gátló szerekkel végzett adjuváns kemoterápiára való alkalmasság kiválasztására.

Oxidatív stressz és peroxinitrit-képződés koraszülöttek retinopathiája (ROP)-ban

A ROP patogenezisében vitathatatlan az oxidatív stressz szerepe. A kis súlyú újszülöttek kezelésében alkalmazott nagy koncentrációjú oxigénkezelés kedvező a peroxidok kialakulásához. Ezen elmélet alapján számos támadásponton, mint pl. a hazai szerzők által is publikált kelátképző D-penicillammal is kezdődtek sikeres kísérletek.¹⁵ Mindezek ellenére azonban a ROP kezelése és megelőzése a mai napig megoldatlan kérdés. Bár a peroxinitrit szerepét igazolták egérszem oxigén indukálta retinopathiájában,² a PARP, illetve gátlószereinek hatását még nem vizsgálták.

A peroxinitrit és a PARP-aktiváció szerepe a retinakárosodás kialakulásában

A glaucoma patogenezisében központi szerepet játszik a nervus opticus neuropathia, mely gliasejtaktivációval, véráramlási zavarokkal és szöveti „remodeling”-gel együtt hozza létre a jellegzetes patológiai képet, amiben az oxidatív stressz szerepe jól dokumentált.

Siu és mtsai patkányok perilimbális/episclerális drenáló ereiben lézerrel termális koagulációt okozva fokozott szemnyomást váltott ki.²⁵ A tartósan fennálló szemnyomás-fokozódás megnövekedett NO-termelést és retinalis ganglionsejtelhalást eredményezett. *Flammaer és Mozaffarieh* szerint az astrocyták által termelt NO az axonok mitokondriumaiban képződő szuperoxiddal hozhat létre peroxinitritet, amely a sejtelhalásért közvetlenül felelős RNI speciesz lehet.⁹

A neuronális degeneráció a retina ganglionsejtjein is túlterjed. Kísérletes unilaterális glaucoma majommodelljében *Luthra és mtsai* kimutatták, hogy a nucleus geniculatus lateralis (NGL) neuronjainak degenerációja során is fokozott tirozinnitrálás figyelhető meg.¹⁶ Fokozott tirozinnitrálás kimutatható volt az NGL ereinek endotheliumában is. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a peroxinitritnek szerepe lehet az NGL neuronjainak pusztulásában. Az erek falában képződő peroxinitrit endothelialis diszfunkciót is kiválthat,²⁶ melynek révén úgyszintén hozzájárulhat az NGL-sejtek pusztulásához. Bár glaucoma-modellben nem vizsgálták a PARP-aktiváció patogenetikai szerepét, de diabeteses endotheliopathiában a peroxinitrit a PARP-aktiváció révén okoz endothelialis diszfunkciót. Így valószínűsíthető, hogy a PARP-aktiváció glaucomában is endothelialis diszfunkciót okoz. Ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

A glutamát által az NMDA (N-metil-D aszpartát) receptorokon keresztül kiváltott excitotoxicitás patoló-

giai szerepe a glaucoma mellett más, ischaemián alapuló kórképben is ismert. Az ischaemia során kiszabaduló glutamát részben az NMDA receptorok ingerlésével okoz nNOS (neuronális NOS)-aktivációt. Stroke állatmodelljeiben, illetve neuronális sejtenyészetek NMDA receptorainak stimulációjával korábban kimutatták mind a peroxinitrit, mind a PARP-aktiváció szerepét a neuronpusztulásban. Az NMDA-stimulációval retinakárosodás is lehet modellezni.²⁰ Az NMDA által okozott dózisfüggő retinakárosodásra jellemző az elvékonyodó belső retina, míg a fotoreceptorsejtek nem változnak szignifikánsan. A VEP-válasz csökkent változatlan ERG mellett. Nyúlretinán végzett *in vivo* kísérletben a 3-aminobenzamid PARP-gátló szer azonban mind a szövettani, mind az elektrofiziológiai vizsgálatokban gyengébb hatást mutatott az NMDA-gátló szernél. A fenti vizsgálathoz hasonlóan egy jóval erősebb PARP-gátló szerrel is a PARP parciális szerepét igazolták az NMDA általi retinatoxicitásban.¹⁰ Itt ugyan a PJ34 jelű szerrel sikerült csökkenteni az NMDA okozta PARP-aktivációt és ATP-szintcsökkenést, a PJ34+NMDA-val kezelt retinákban továbbra is megfigyelhető volt a membránszelektivitás elvesztése, ami nekrozisra utal, másrészt sokkal intenzívebb megfestődés és apoptózisjelek voltak megfigyelhetők, mint a csupán NMDA-val kezelt retinákban. Ez összhangban van a PARP-aktiváció apoptózis-nekrozis átkapcsoló szerepével.

Hasonlóan a myocardialis és agyi ischaemiát követő reperfúzióhoz, a retina esetében is bizonyítást nyert a PARP-gátlók protektív szerepe ischaemia-reperfúzió szindrómában.⁶ Az I/R modellezése Lewis patkányszemen a szemnyomás átmeneti megemelésével történt. Ezután jellemzően a retina belső rétegei károsodtak. Az ekkor megfigyelhető sejtpusztulás és retinaelvékonyodás a PARP-gátló 3-aminobenzamiddal kivédhető volt, hatása leginkább az ischaemia kialakulása után 12–18 órával érvényesült, ami a szer egy esetleges terápiás alkalmazása esetén igen kedvező ablakperiódust nyújthat. A retina I/R károsodásában a neuronális elemek mellett a vascularis elemek is károsodnak, s miután az idegsejtpusztulás megelőzi az érkárosodást, feltételezhető, hogy a neuroglia károsodása is vezethet szekunder érkárosodáshoz, nem csak fordítva. Ebben a folyamatban az iNOS, a TNF- α és az ICAM-1 gyulladásgéneket fontos szerepet játszanak.³⁵

Míg az ischaemiás károsító hatások primeren inkább a retina belső rétegeit érintik, a retina külső rétegeiben elhelyezkedő sejtek fokozott oxidatív érzékenységet is több ismert tény támasztja alá. A pálcikák külső szegmensében található hosszú láncú, többszörösen telítetlen zsírsavak, köztük a legjellemzőbb dokozahexaénsav (DHA) különösen érzékeny peroxidációra. Emellett a mitokondriumokban gazdag pálcák, a retina gazdag vérellátása, az állandó fényexpozíció kedveznek a reaktív specieszek termelődésének. A fiziológias körülmények között is megfigyelhető proteinnitráció mellett fény hatására a pálcák külső szegmens csökkenő, majd az erős fényt követő sötét periódus alatt növekvő nitrációját figyelték meg, amit antioxidánsal mindkét periódus alatt csökkenteni lehetett. Felmerült, hogy a fokozott ROS-ter-

melődés és a fehérjék nitrálódása a fény indukálta fotoreceptor-apoptózis láncszeme lehet.²²

Az időskori makuladegeneráció (AMD) patogenezisében központi szerepet játszik az RPE (retina-pigment-epithelium) diszfunkciója. A fotoreceptor külső szegmens fagocitózisa által az RPE is fokozottan ki van téve oxidatív hatásoknak. Ezért, s miután az RPE posztmitotikus sejt, érthető, hogy különösen hatékony DNS-repair rendszerrel bír. ARPE¹⁹ (humán RPE) sejtvonalon igazolták, hogy ebben a védelemben a PARP aktivációja fontos szerepet játszik.¹¹

A fotoreceptorsejtek genetikai zavara esetén is progresszív oxidatív károsodást figyeltek meg. Az egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegség, a retinitis pigmentosa (RP) „rd1” egérmodelljében igazolták a csapok pusztulásában a peroxinitrit indukálta nitrozatív károsodás¹³ és a PARP szerepét is.²³ Míg a PARP-expresszió az rd1 és a vad típusú egereknél egyforma volt, a PARP aktivitását jelző PAR-polimerek fokozottabb mennyiségben fordultak elő az rd1 fotoreceptorsejtekben. A PAR előfordulása kolokalizációt mutatott az apoptózis markereként alkalmazott TUNEL-festéssel. Ezért lehetséges, hogy a PARP-aktivációnak szerepe van a RP-ban megfigyelhető sejthalálban.²³

A peroxinitrit és PARP szerepe a diabeteses retinopathia (DR) kialakulásában

A diabeteses neuropathiában, nephropathiában, retinopathiában és makrovaszkuláris szövődményekben kulcsszerepet játszó endothelialis diszfunkció a leginkább dokumentált patológiai elváltozás, mely a hyperglykaemia hatására alakul ki, megzavarva az ér endothelsejtjeinek homeosztázisát. Ennek következtében oxidatív mediátorok szabadulnak fel, és az eNOS- és iNOS-expresszió is fokozódik. A következményes NO-termelés, peroxinitrit-képződés vezet DNS-törésekhez, ez pedig PARP-aktivációhoz. A PARP-mediált celluláris NADPH-depléción közvetlenül gyengíti az erek relaxációját.¹² A hyperglykaemia emellett az aldózreduktáz (AR) aktivitásának fokozásán keresztül is NADPH-depléciónhoz és szabadgyök-képződéshez vezet. Bár az AR biokémiai útvonala nincs közvetlen összefüggésben a PARP útvonallal, kimutatták, hogy az AR gátlása fiderastattal csökkenti a diabetes által indukált nitrozatív stresszt és a következményes PARP-aktivációt a retinában.¹⁹ A fenti folyamatok végeredményeként csökken az endothelsejtek NO-kiáramlása, emiatt csökken az endothelfelszín antitrombotikus hatása, fokozódik a trombocitaadhéziós hajlam, és csökken az érsimaizom bazális vazodilatációs tónusa, aminek következménye vazospazmus és ischaemia.

A peroxinitrit és a PARP szerepe a diabeteses nephropathia, neuropathia és retinopathia patogenezisében ismert tény.¹² A diabeteses érelváltozásokban kulcsszerepet játszó endotheldiszfunkció nemcsak megelőzhető, hanem meg is fordítható PARP-gátló szerek adásával.²⁶ A diabeteses retinopathiában fokozott nitro-tirozin-képződést és PARP-aktivitást figyeltek meg. Míg a nitro-tirozin csak az erek falában volt kimutatható,⁸ a PARP

a neurális és vaszkuláris elemekben egyaránt.³⁶ Utóbbi szerzők a retina összes magvas rétegében és emellett a kapillárisok endotheljében és a pericitákban is fokozott PARP-aktivitást észleltek diabeteses patkányretinákban. Ebben a kísérletben *in vivo* és retina endothel-sejtenyészeten *in vitro* is alátámasztották, hogy a PJ34 szignifikánsan gátolja a hyperglykaemia által kiváltott fokozott endothel-sejthalált. Érdekes megfigyelés, hogy a nitro-oxidatív stressz nyomai már a DR korai szakaszában megfigyelhetők, ugyanakkor a cukorháztartás rendezése után is még sokáig perzisztálnak, különösen akkor, ha a korábbi rendezetlen anyagcsere-állapot hosszabb ideig fennállt.¹⁴

Ahogy korábban más sejteken is igazolták, kiderült, hogy a PARP-1 a retinasejtekben is a NF κ B koaktivátoraként fejt ki hatását. Az NF κ B aktivitás mellett az ICAM-1 expressziója is fokozódott a diabeteses retinákban, ugyanakkor a PARP-gátló szerekkel mindkét jelenség csökkenthető volt. Tekintettel arra, hogy mind a fenti molekulák, mind a PARP szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok közvetítésében is, a diabeteses retinopathia patogenezisében gyulladásos folyamatok is szerepet játszhatnak.³⁶

Más vizsgálatok igazolták a retinopathia későbbi, ér-újdonképződés által dominált szakaszában is a PARP szerepét. PARP-gátlók hatására az endothelsejtek proliferációjának, valamint a VEGF kiváltotta migrációs és mitogén hatások csökkenését figyelték meg.²⁴ HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) kultúrán végzett kísérletben a PARP-gátlás fokozta a magas glükózsint által kiváltott PEDF- (pigment epithelium-derived factor) szintézist.⁵ Szemben a VEGF hatásával, a PEDF a retinában az angiogenesis gátlójaként ismert, míg a CNV-re (choroidal neovascularisation) gyakorolt hatása ellentmondásos. Kisebb dózisban csökkenti a CNV-t, míg nagyobb PEDF-dózis mellett szignifikánsan növekedett a CNV kialakulása. A PEDF angiogenezist támogató és gátló hatása nemcsak a dózis függvénye, hanem egy komplex szabályozási folyamat eredménye.

Összefoglalás

A DR-ban a peroxinitrit/PARP útvonal központi szerepe több szempontból is igazoltnak tűnik. Ugyanakkor a PARP-gátlókkal elért eredmények biztatóak lehetnek a DR új terápiás megközelítésében. A VEGF-fel kapcsolatos eredmények a PARP-gátlók angiogenesis ellenes hatásának bizonyításával más eredetű proliferatív retinopathiákban, sőt tumorterápiákban is új lehetőségeket rejtenek. Bár a szemészeti kórképek többségében a peroxinitrit/PARP-aktivációval kapcsolatos ismeretek kezdetlegeseek, néhol ellentmondások, a folyamatok sejtszintű, illetve *in vivo* eseményeinek megismerése később olyan kórképekben is felvetik egy új kezelés lehetőségét, mint az öröklődő retinadisztrófiák, tumorok, uveitisek, proliferatív kórképek, melyekben eddig nem vagy csak nagyon kevés lehetőség mutatkozott a gyógyításra. Ezeknek az új lehetőségeknek a preklinikai és később klinikai vizsgálatok során történő megerősítése a jövő kihívása.

Irodalom

- Behndig A., Svensson B., Marklund S.L., Karlsson K.: Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 471-475.
- Brooks S.E., Gu X., Samuel S., Marcus D.M., Bartoli M., Huang P.L., Caldwell R.B.: Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 222-228.
- Brown D.J., Lin B., Chwa M., Atilano S.R., Kim D.W., Kenney M.C.: Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis* 2004; 10: 281-288.
- Buddi R., Lin B., Atilano S.R., Zorapapel N.C., Kenney M.C., Brown D.J.: Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 341-351.
- Chen H., Jia W., Xu X., Fan Y., Zhu D., Wu H., Xie Z., Zheng Z.: Upregulation of PEDF expression by PARP inhibition contributes to the decrease in hyperglycemia-induced apoptosis in HUVECs. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 718-724.
- Chiang S.K., Lam T.T.: Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3210-3214.
- Csete B., Lengyel Z., Kádár Z., Battyáni Z.: Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase-1 Expression in Cutaneous Malignant Melanomas as a New Molecular Marker of Aggressive Tumor. *Pathol Oncol Res* 2008 Aug 28.
- Du Y., Smith M.A., Miller C.M., Kern T.S.: Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem* 2002; 80: 771-779.
- Flammer J., Mozaffarieh M.: What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? *Surv Ophthalmol* 2007; 52: 162-173.
- Goebel D.J., Winkler B.S.: Blockade of PARP activity attenuates poly(ADP-ribosylation) but offers only partial neuroprotection against NMDA-induced cell death in the rat retina. *J Neurochem* 2006; 98:1732-1745.
- Jarrett S.G., Boulton M.E.: Poly(ADP-ribose) polymerase offers protection against oxidative and alkylation damage to the nuclear and mitochondrial genomes of the retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Res* 2007; 39: 213-223.
- Kiss L., Szabó Cs.: The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 29-37.
- Komeima K., Usui S., Shen J., Rogers B.S., Campochiaro P.A.: Blockade of neuronal nitric oxide synthase reduces cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 905-912.
- Kowluru R.A.: Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003; 52: 818-823.
- Lakatos L., Hatvani I., Oroszlán G., Balla G., Karmazsin L., Alaka O., Kincses E., Szabó I., Lakatos Z.: Controlled trial of D-penicillamine to prevent retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr Hung* 1986; 27: 47-56.
- Luthra A., Gupta N., Kaufman P.L., Weinreb R.N., Yücel Y.H.: Oxidative injury by peroxynitrite in neural and vascular tissue of the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 2005; 80:43-49.

17. Mabley J.G., Jagtap P., Perretti M., Getting S.J., Salzman A.L., Virág L., Szabó E., Soriano F.G., Liaudet L., Abdelkarim G.E., Haskó G., Marton A., Southan G.J., Szabó Cs.: Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Inflamm Res* 2001; 50: 561-569.
18. Miki K., Yoshizawa K., Uehara N., Yuri T., Matsuoka Y., Tsubura A.: PARP inhibitors accelerate N-methyl-N-nitrosourea-induced cataractogenesis in Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 2007; 21: 739-744.
19. Obrosova I.G., Pacher P., Szabó C., Zsengeller Z., Hirooka H., Stevens M.J., Yorek M.A.: Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes* 2005; 54: 234-242.
20. Oku H., Goto W., Okuno T., Kobayashi T., Sugiyama T., Ota T., Yoneda S., Hara H., Ikeda T.: Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor on NMDA-induced retinal injury. *Curr Eye Res* 2004; 29: 403-411.
21. Pacher P., Szabó Cs.: Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* 2007; 25: 235-260.
22. Palamalai V., Darrow R.M., Organisciak D.T., Miyagi M.: Light-induced changes in protein nitration in photoreceptor rod outer segments. *Mol Vis* 2006; 12: 1543-1551.
23. Paquet-Durand F., Silva J., Talukdar T., Johnson L.E., Azadi S., van Veen T., Ueffing M., Hauck S.M., Ekström P.A.: Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. *J Neurosci* 2007; 27: 10311-10319.
24. Rajesh M., Mukhopadhyay P., Godlewski G., Bátkai S., Haskó G., Liaudet L., Pacher P.: Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 1056-1062.
25. Siu A.W., Leung M.C., To C.H., Siu F.K., Ji J.Z., So K.F.: Total retinal nitric oxide production is increased in intraocular pressure-elevated rats. *Exp Eye Res* 2002; 75: 401-406.
26. Soriano F.G., Virág L., Szabó C.: Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med* 2001; 79: 437-448.
27. Spector A., Ma W., Sun F., Li D., Kleiman N.J.: The effect of H₂O₂ and tertiary butyl hydroperoxide upon a murine immortal lens epithelial cell line, alphaTN4-1. *Exp Eye Res* 2002; 75: 573-582.
28. Staibano S., Pepe S., Lo Muzio L., Somma P., Mascolo M., Argenziano G., Scalvenzi M., Salvatore G., Fabbrocini G., Molea G., Bianco A.R., Carlomagno C., De Rosa G.: Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol* 2005; 36: 724-731.
29. Szabó Cs., Dawson V.L.: Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 287-298.
30. Varma S.D., Hegde K.R.: Lens thiol depletion by peroxynitrite. Protective effect of pyruvate. *Mol Cell Biochem* 2007; 298(1-2): 199-204.
31. Virág L., Salzman A.L., Szabó Cs.: Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol* 1998; 61: 3753-3759.
32. Virág L., Szabó Cs.: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
33. Yanagiya N., Akiba J., Kado M., Hikichi T., Yoshida A.: Effects of peroxynitrite on rabbit cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238: 584-588.
34. Zaniolo K., Gingras M.E., Audette M., Guérin S.L.: Expression of the gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase-1 is modulated by fibronectin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4199-4210.
35. Zheng L., Gong B., Hatala D.A., Kern T.S.: Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 361-367.
36. Zheng L., Szabó Cs., Kern T.S.: Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 2004; 53: 2960-2967.

Levelezési cím: Dr. Géhl Zsuzsanna
Semmelweis Egyetem, Szemészeti Klinika
1083 Budapest, Tömő u. 25-29.

E-mail: zgehl@freemail.hu

vagy

Prof. Dr. Virág László
Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani intézet OEC
4012 Debrecen, Nagyterdei krt. 98.

E-mail: lvirag@dote.hu